

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO DE CULTURA SUSTENTÁVEL PARA  
PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Arthrospira platensis***

Aluno: Giovanne Brogiato

Orientador: Dra. Elisa Esposito

São José dos Campos, 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO DE CULTURA SUSTENTÁVEL PARA  
PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Arthrospira platensis***

Projeto a ser desenvolvido como  
Trabalho de Conclusão de Curso para  
conclusão do curso e obtenção do  
título de Bacharel em Biotecnologia.

Aluno: Giovanne Brogiato

Orientador: Dra. Elisa Esposito

São José dos Campos, 2021.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha mãe, irmão, irmã e amigos por terem me incentivado e apoiado em minhas escolhas, a continuar e finalizar essa etapa da minha vida. Agradeço também ao apoio, orientação e ajuda de todo grupo do laboratório de Microbiologia Aplicada e Nutrição de Abelhas e à minha orientadora Elisa. Por fim, agradeço a todos que tornaram este trabalho possível, a Cargill e a Obra Social Célio Lemos, pelo financiamento do projeto, ao Banco de Microrganismos Aidar & Kutner do Instituto Oceanográfico da USP pelo fornecimento das cepas e ao Sr. Peter da Fazenda Santa Bárbara Orgânicos, por disponibilizar o espaço para aplicação.

**Resumo:** *Arthrospira platensis* é uma cianobactéria multicelular, filamentosa e fotossintetizante também conhecida como *Spirulina* devido ao seu formato helicoidal. Por conta da sua composição rica em proteínas, vitaminas, minerais e fitonutrientes esta cianobactéria é um excelente alimento, considerada o “Alimento do futuro” pela ONU em 1974 e sendo hoje amplamente comercializada. A *Spirulina* possui também propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, que somadas à sua composição química garantem diversas aplicações biotecnológicas como produção de fármacos, nutracêuticos e uso como biofertilizante. Devido ao amplo potencial desta cianobactéria, o objetivo desse estudo foi formular um meio de cultura alternativo ao meio Zarrouk, utilizado como padrão para o cultivo em laboratório de *A. platensis*, para a produção de biomassa de *A. platensis* usando como suplemento chorume proveniente de compostagem orgânica, fornecendo assim benefícios como o barateamento da produção, redução do consumo de água e aproveitamento deste resíduo. Também foi validada a possível aplicação da biomassa produzida no meio de cultura alternativo. Os resultados obtidos foram satisfatórios mostrando um bom desempenho do uso do meio alternativo e também o potencial do uso como biofertilizante.

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1. <i>Arthrospira platensis</i> .....	6
1.2. Meio de cultura alternativo.....	7
1.2.1. Carbono e Nitrogênio.....	7
1.2.2. Chorume.....	8
2. OBJETIVO.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3.1. Microrganismo.....	10
3.2. Meio de cultura.....	10
3.3. Estudo piloto.....	12
3.4. Medida do crescimento da biomassa de <i>A. platensis</i> .....	13
3.5. Determinação da morfologia por M.O.....	13
3.6. Ampliação de escala.....	13
3.7. Ensaio analítico.....	15
3.8. Ensaio piloto de <i>A. platensis</i> como biofertilizante.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1. Estudo piloto.....	22
4.2. Ampliação de escala.....	27
4.3. Ensaio analítico.....	37
4.4. Ensaio piloto de <i>A. platensis</i> como biofertilizante.....	38
5. CONCLUSÃO.....	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Arthrospira platensis*

Atualmente o número aproximado de espécies de cianobactérias descritas é de 2700 e estimativas mostram a possibilidade de existirem até 8159 espécies, aproximadamente 57% destas ainda não foram descritas (NABOUT et al., 2013). Ainda assim, nas espécies já estudadas encontra-se um imenso potencial biotecnológico. Destas diversas espécies existem estudos mostrando a aplicação destes organismos nas áreas de produção de fármacos, produção de compostos como biocombustíveis, suplementação alimentar e aplicações na agricultura e ambientais (ZAHRA et al., 2020).

*Arthrospira platensis* e *Arthrospira maxima* (*Spirulina*) são as espécies mais populares do gênero. Caracterizadas pela forma espiralada e tricomas dispostos em forma de hélice aberta envoltos de uma bainha mucilaginosa são encontradas em uma variedade de ambientes alcalinos, água doce e água salgada. De interesse biotecnológico, a *A. platensis* foi a primeira cianobactéria comercializada, com uma produção estimada de biomassa de 2000 toneladas no ano 2000 (HANDB. MICROALGAL CULT., 2013).

Esta espécie é amplamente utilizada como suplementação de proteína para humanos e animais, produção de químicos para diagnósticos clínicos e produção de fármacos. Seu uso como suplemento fornece benefícios a modulação do sistema imunológico, atividade antiviral, estudos em propriedades preventivas ao câncer e benefícios cardiovasculares (CAPELLI; CYSEWSKI, 2010). Apresentando até 70% de proteína em sua composição, além de vitaminas e minerais como  $\beta$ -caroteno, vitaminas B1, B2, B3, B6 e B12, cálcio, potássio e ferro e também todos os aminoácidos essenciais (BERNAL-CASTILLO; ROZO; RODRÍGUEZ, 2003).

Além do aproveitamento das propriedades benéficas da *A. platensis* nos setores de produção de fármacos e alimentação, um tópico que ganhou espaço mais recentemente é o potencial desta cianobactéria na agricultura. Podendo ser usada como uma fonte rica de macro e micronutrientes para plantas, como vitaminas, aminoácidos, polipeptídeos, giberelinas, auxinas, citoquininas antioxidantes e

compostos com propriedades antibacterianas e antifúngicas (GODLEWSKA et al., 2019).

## **1.2. Meio de cultura alternativo**

A produção comercial de *A. platensis* é quase exclusivamente feita em reatores abertos do tipo raceway, sendo vantajoso em termos econômicos devido a redução de investimento para construção e manutenção destes e uso de energia solar. Apesar das vantagens econômicas neste tipo de produção, o rendimento nestes reatores é muito baixo comparado a faixa teórica e à produtividade observada em fotobiorreatores fechados, que em contrapartida necessitam de alto investimento (JIMÉNEZ et al., 2003). Pensando em uma possível solução para a baixa produção do modelo raceway, uma possível alternativa seria a alteração do meio de cultura sendo suplementado com fontes de nutrientes economicamente viáveis.

### **1.2.1. Carbono e Nitrogênio**

Para a formulação de um meio de cultura é necessário otimizar os nutrientes disponibilizados de forma que o produto desejado seja favorecido, neste caso deseja-se favorecer a produção de biomassa e de proteínas das células. O meio padrão utilizado para produção de biomassa da *Arthrospira platensis* é o meio Zarrouk (ZARROUK, 1966).

As cianobactérias são organismos fotossintetizantes e, portanto, fixam  $\text{CO}_2$  em glicose com uma sequência de reações do chamado ciclo de Calvin, utilizando água, luz, moléculas de adenosina trifosfato (ATP) e através da ação da enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO) (LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., & COX, 2009).

Em ambiente aquoso na natureza o  $\text{CO}_2$  dissolvido está em equilíbrio químico com  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{CO}_3^{2-}$  que são rapidamente transformados entre eles, mantendo o equilíbrio, e cuja concentração depende do pH e temperatura. As cianobactérias de modo geral preferem o uso de  $\text{HCO}_3^-$  ao uso de outras formas de carbono mesmo que este seja uma fonte mais pobre de carbono, favorecendo o uso de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) no meio de cultura já que este ionizado produzirá a molécula de preferência (KUMAR et al., 2011).

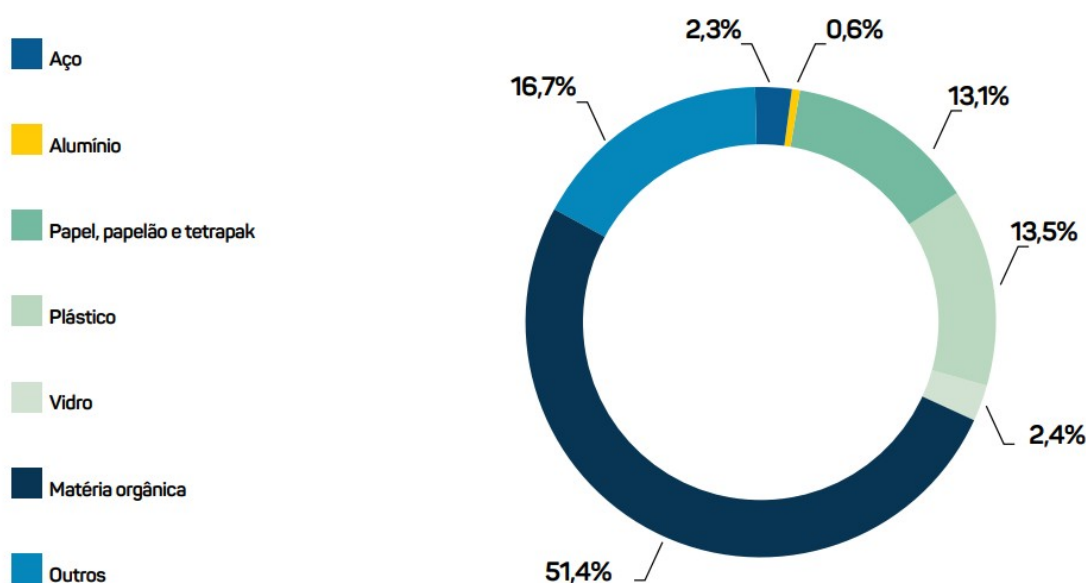
Outro nutriente necessário para o crescimento das cianobactérias é o nitrogênio. Este é assimilado pelas cianobactérias e é utilizado primeiramente para crescimento celular e o excesso deste é armazenado na forma de compostos orgânicos, por exemplo proteínas. Deste modo a quantidade de nitrogênio fornecido influencia o crescimento e a composição da biomassa de *A. platensis* (RODRIGUES et al., 2010).

As fontes de carbono e nitrogênio são as mais importantes para a produção de biomassa de *A. platensis*, visando o barateamento de produção, bases substitutas para a produtividade desta cianobactéria tem sido relatadas na literatura (AVILA-LEON et al., 2012) e a capacidade heterotrófica encontrada em algumas cianobactérias (MULITERNO et al., 2005).

### **1.2.2. Chorume**

De acordo com o Plano Nacional de Resíduos sólidos, estima-se que da composição gravimétrica de resíduos sólidos urbanos (RSU) 51,4% correspondam a matéria orgânica (Figura 1) e que em 2018 a geração de RSU alcançou 1,039 kg/hab/dia. Este mesmo documento afirma estímulos de financiamento governamental para processos de reciclagem de resíduos orgânicos através de processos de compostagem locais, com previsões para haver iniciativas de valorização de resíduos orgânicos em 100% do país até 2040 (PNRS, 2020).





Fonte: PNRS, 2012

**Figura 1:** Estimativa da Composição Gravimétrica média dos RSU coletados no Brasil (PNRS, 2020).

O tratamento adequado e separação destes resíduos é necessário uma vez que a matéria orgânica presente em locais comuns de descarte, como aterros sanitários, será decomposta e quando em contato com outros tipos de resíduo, somadas ao controle inadequado do processo resultarão na emissão descontrolada de gases e em um chorume rico em metais pesados com potencial para contaminar águas e solos (RAGHAB; ABD EL MEGUID; HEGAZI, 2013).

A compostagem é a alternativa de reciclagem de resíduos orgânicos, neste processo os resíduos sofrem transformações metabólicas através da umidade e ação de bactérias, fungos, actinobactérias, protozoários, larvas e insetos. Após a digestão da matéria orgânica, liberaram diversos nutrientes como nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, ferro e cálcio (AVANCINI et al., 2019). O processo realizado da maneira correta resulta em um chorume altamente nutritivo e que não causa danos ambientais, sendo amplamente utilizado como adubo (VALENTE et al., 2011).

Desta forma com a devida separação dos resíduos orgânicos, a produção controlada de chorume pela compostagem e o potencial nutritivo deste produto, este mostra-se um excelente suplemento para o cultivo de cianobactérias. Barateando a produção e direcionando o produto da reciclagem de matéria orgânica.

## 2. OBJETIVO

As cianobactérias são de maneira geral organismos com excelente potencial biotecnológico e comercial, a cada ano com mais estudos e impactos em diversas áreas. Uma das principais maneiras de ampliar o potencial comercial destes é o barateamento da produção mantendo produtividade e eficiência.

Visando analisar uma possível alteração do meio de cultura padrão de *A. platensis* e alinhando isso a duas áreas de aplicação destes organismos, sendo estas ambiental e agricultura. Este estudo objetivou utilizar os resíduos sólidos orgânicos, tipo de resíduo urbano mais abundante, para o cultivo destes microrganismos. Além disso, este estudo objetivou avaliar a aplicação da biomassa produzida como bioinoculante, avaliando o desempenho destas cianobactérias para fornecer benefícios para o crescimento e desenvolvimento de plantas.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Microrganismo

Neste estudo utilizou-se a cianobactéria *Arthrospira platensis* (cepa BMAKD7), disponibilizada pelo Banco de Microrganismos Aida & Kutner do Instituto Oceanográfico da USP. As cianobactérias foram mantidas seguindo as orientações fornecidas e mantidas em meio Bold Basal modificado (BOLD, 1949).

### 3.2. Meio de cultura

Como base para formulação do meio de cultura utilizou-se o meio Zarrouk (ZARROUK, 1966), meio padrão utilizado para produção de biomassa de *A. platensis*. Este meio utiliza  $\text{NaHCO}_3$  como fonte de carbono e  $\text{NaNO}_3$  como fonte de nitrogênio. Para este experimento as concentrações deste nutriente foram modificadas de acordo com a literatura e descrito na Tabela 1.

**Tabela 1:** Composição meio de cultura Zarrouk modificado

Reagentes	Concentração (g/L)
NaNO <sub>3</sub>	2,5
NaCl	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,175
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,075
NaHCO <sub>3</sub>	16
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,013
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
EDTA-Na <sub>2</sub>	0,05
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,004
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,004
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0015
Cl <sub>2</sub> Mn.4H <sub>2</sub> O	0,00024
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,00024
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	6,00E-05
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0002

Para a concentração de nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>), sabendo a importância deste nutriente no armazenamento de compostos orgânicos, utilizou-se a concentração padrão do meio de cultura escolhido de 2,5 g/L após verificação de bons resultados quanto a produtividade, composição proteica, lipídica e de compostos fenólicos (COLLA et al., 2007).

Quanto a concentração de carbono visou-se uma concentração que favorece-se a maior produtividade, utilizando portanto a concentração de 16 g/L valor estimado com base na literatura com testes com variação da concentração de ambas fontes, nitrogênio e carbono, e de luz (CASTRO et al., 2015).

Foram então estabelecidas modificações na formulação do meio de cultura para testes com suplemento de chorume proveniente de compostagem orgânica, glicose como fonte de carbono e ureia como fonte de nitrogênio com testes individuais mostrados no Quadro 1. Os lotes de chorume utilizados foram fornecidos pela Obra Social Célio Lemos. Estes lotes não continham informações sobre sua composição, por este motivo, foram necessários testes para verificar o potencial deste material para suplementação do meio de cultura.

### Quadro 1: Modificações propostas para testes com chorume de compostagem orgânica, ureia e glicose

Modificações	
Chorume	NaNO <sub>3</sub> e NaHCO <sub>3</sub> mantidos e todos os outros nutrientes substituídos por 10% de chorume em volume
	NaNO <sub>3</sub> e NaHCO <sub>3</sub> mantidos e todos os outros nutrientes substituídos por 20% de chorume em volume
	NaNO <sub>3</sub> e NaHCO <sub>3</sub> mantidos e todos os outros nutrientes substituídos por 30% de chorume em volume
Ureia	Nutrientes mantidos com exceção do NaNO <sub>3</sub> , substituído por 0,25 g/L de ureia
	Nutrientes mantidos com exceção do NaNO <sub>3</sub> , substituído por 0,5 g/L de ureia
Glicose	Nutrientes mantidos com exceção do NaHCO <sub>3</sub> , substituído por 2 g/L de glicose

### 3.3. Estudo piloto

O estudo piloto foi proposto para testar a viabilidade do uso de ureia como fonte de nitrogênio, glicose como fonte de carbono e chorume como suplemento do meio de cultura separadamente. A formulação dos meios utilizados estão dispostas na tabela 3.

O inóculo utilizado para as culturas com glicose e ureia foi retirado de uma repicagem em meio padrão (tabela 1) crescida por 10 dias, para as culturas suplementadas com chorume a repicagem já havia sido feita no meio de cultura com o respectivo volume de chorume (Tabela 2), também crescido por 10 dias.

As culturas realizadas foram de 50 mL em frascos transparentes e inoculadas com 10% do volume total, mantidas em condições ambientes de luminosidade e temperatura por 14 dias em processo descontínuo e as amostras coletadas em dias alternados. Não houve necessidade de controle de pH, mantido dentro da faixa ótima para a *A. platensis* para todos os casos entre 9 e 10 (SÁNCHEZ-LUNA et al., 2007).

**Tabela 2:** Meios de cultura testados no estudo piloto

Reagentes	Quantidade					
Ureia	0,25 g/L	0,5 g/L	-	-	-	-
Glicose	-	-	2 g/L	-	-	-
Chorume de compostagem orgânica	-	-	-	10% em volume	20% em volume	30% em volume
NaNO <sub>3</sub>	-	-	2,5 g/L	2,5 g/L	2,5 g/L	2,5 g/L
NaCl	5 g/L	5 g/L	5 g/L	-	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,175 g/L	0,175 g/L	0,175 g/L	-	-	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,075 g/L	0,075 g/L	0,075 g/L	-	-	-
NaHCO <sub>3</sub>	16 g/L	16 g/L	-	16 g/L	16 g/L	16 g/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,013 g/L	0,013 g/L	0,013 g/L	-	-	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g/L	0,2 g/L	0,2 g/L	-	-	-
EDTA-Na <sub>2</sub>	0,05 g/L	0,05 g/L	0,05 g/L	-	-	-
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,004 g/L	0,004 g/L	0,004 g/L	-	-	-
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,004 g/L	0,004 g/L	0,004 g/L	-	-	-
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0015 g/L	0,0015 g/L	0,0015 g/L	-	-	-
Cl <sub>2</sub> Mn.4H <sub>2</sub> O	0,00024 g/L	0,00024 g/L	0,00024 g/L	-	-	-
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,00024 g/L	0,00024 g/L	0,00024 g/L	-	-	-
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,00006 g/L	0,00006 g/L	0,00006 g/L	-	-	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0002 g/L	0,0002 g/L	0,0002 g/L	-	-	-

### 3.4. Medida do crescimento da biomassa de *A. platensis*

Para a medida de biomassa inicialmente foi feita uma varredura para identificar o comprimento de onda ideal dentro da faixa encontrada em diferentes metodologias. A densidade ótica foi então medida em placa de micropoços em triplicata com 200 µL a 680 nm no espectrofotômetro Sinergy H1 da marca Biotek (Vermont, EUA).

### 3.5. Determinação da morfologia por M.O.

Foram preparadas placas para observação da morfologia, que foi feita em Microscópio ótico DM500 da marca Leica (Wetzlar, Alemanha).

### 3.6. Ampliação de escala

Os fotobiorreatores foram montados utilizando como base uma caixa organizadora com 29L de capacidade, nas quais foram acopladas lâmpadas de LED de 18 W, ligadas a um temporizador programado para 12 h de tempo de luz por dia e tiveram o fluxo luminoso medido. Levando em consideração as variações de luminosidade do laboratório e as diferentes profundidades que as células estavam posicionadas dentro da caixa, mediu-se uma variação de 1570 à 2500 lux, sem a presença dos meios de cultura e células, que influenciam na absorção de luz. A faixa de luminosidade obtida está dentro de boas condições estabelecidas para o crescimento celular (MULITERNO et al., 2005).

Foram inseridas nas caixas mangueiras acopladas a uma bomba de ar para inalação da marca Medicate, com vazão de 10 L/min, de modo que oxigênio e a

agitação seja fornecido a ambas as culturas, a agitação das células permite com que estas circulem pelo fotobiorreator e não sejam fotoinibidas por receberem muita luz e estejam a maior parte do tempo dentro da faixa ótima de luminosidade.

Inicialmente foi construído somente um fotobiorreator para teste (Figura 2) e os cultivos de controle e amostra realizados separadamente, tendo assim possíveis alterações de temperatura ao longo de cada cultivo. Foram produzidos para este primeiro cultivo 18 L de meio de cultura mais 2 L de inóculo crescido por 10 dias no mesmo meio utilizado, para controle e para o meio alternativo com chorume. Após finalizados foram retirados 2 L de cada cultivo e do chorume utilizado autoclavado e enviados para ensaio analítico.



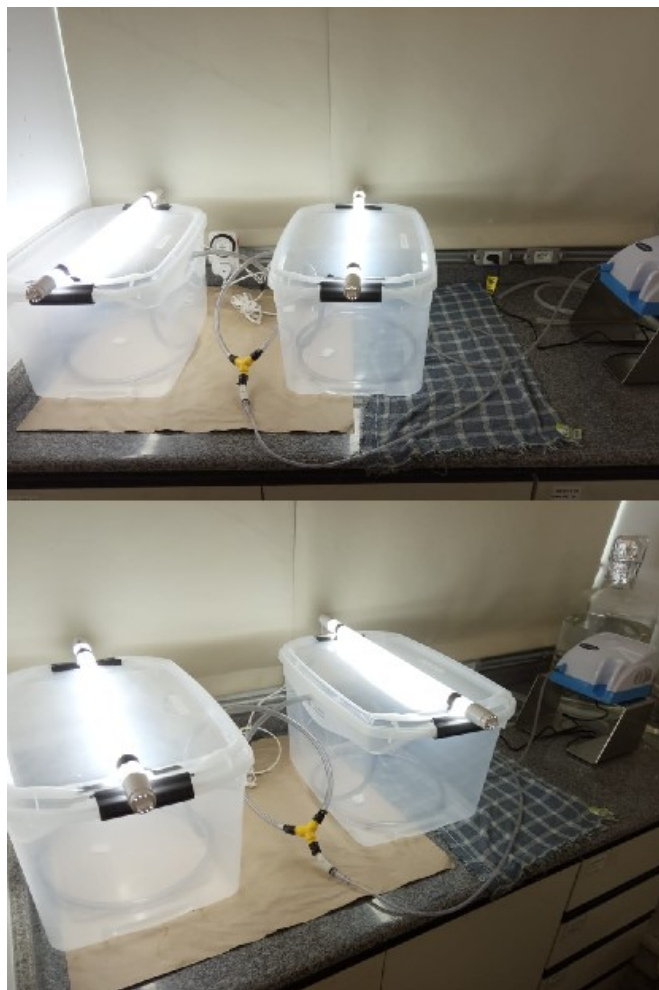
Fonte: Giovanne Brogiato

**Figura 2:** Fotobiorreator construído para cultivo de 20L

Para o segundo teste de ampliação de escala outro fotobiorreator foi montado seguindo a mesma montagem do primeiro, a mesma bomba de ar foi utilizada para ambas com a adição de uma ramificação devidamente vedada na mangueira (Figura 3). Assim controle e amostra foram realizados simultaneamente em processo descontínuo por 12 dias e destes cultivos foram retirados 6 mL a cada dois dias para análise em espectrofotômetro e de massa seca.

A metodologia para a determinação de biomassa foi a mesma utilizada no estudo piloto, realizada em placa de micropoços em triplicata com 200  $\mu$ L a 680 nm

no espectrofotômetro Sinergy H1 da marca Biotek (Vermont, EUA). Para estimar a massa seca foram centrifugados 2 mL em duplicata a 140000 RPM por 10 min na Centrífuga Rotina 420 da marca Hettich (Tuttlingen, Alemanha), removido o sobrenadante e pesados em balança analítica.



Fonte: Giovane Brogiato

**Figura 3:** Fotobiorreatores construídos para cultivo de 20L

### **3.7. Ensaio analítico**

As amostras obtidas nos primeiros testes de ampliação de escala (20L) referentes ao controle, ao meio de cultura alternativo com chorume proveniente de compostagem orgânica e ao lote de chorume utilizado foram enviadas para ensaio analítico realizado pelo laboratório DSMA (Desenvolvimento Sustentável e Monitoramento Ambiental).

### **3.8. Ensaio piloto de *A. platensis* como biofertilizante**

A aplicação da biomassa de *A. platensis* produzida foi realizada com o apoio da Fazenda Santa Bárbara Orgânicos, em Jambeiro. Os 20L produzidos foram retirados (meio de cultura suplementado com chorume proveniente de compostagem orgânica + biomassa) e diluídos com a adição de 40L de água.

A solução diluída foi aplicada em uma plantação pré preparada de alface com período de crescimento de 30 dias (Figura 4) e em brócolis com período de crescimento de 90 dias (Figura 5). A aplicação foi realizada no dia do plantio e novamente na metade do período de crescimento, devido ao período de chuvas a plantação de brócolis foi perdida.

O plantio das alfaces foi realizado no dia 21 de setembro de 2020 e a colheita no dia 22 de outubro de 2020. Durante o período a temperatura em Jambeiro variou entre 16°C e 37°C para a máxima e entre 12°C e 23°C para a mínima.

Foram retiradas a maior e menor alface, visualmente selecionadas, dos plantios com e sem aplicação da *A. platensis* na metade do período de crescimento e 10 amostras de cada plantio, selecionadas aleatoriamente pelo responsável da fazenda, para análise.







Fonte: Giovanne Brogiato

**Figura 4:** Plantação de alface Fazenda Santa Bárbara, Jambeiro. Dia 0, respectivamente A: controle e B: tratadas





Fonte: Giovane Brogiato

**Figura 5:** Plantação de brócolis Fazenda Santa Bárbara, Jambeiro. Dia 0, respectivamente A: controle e B: tratadas

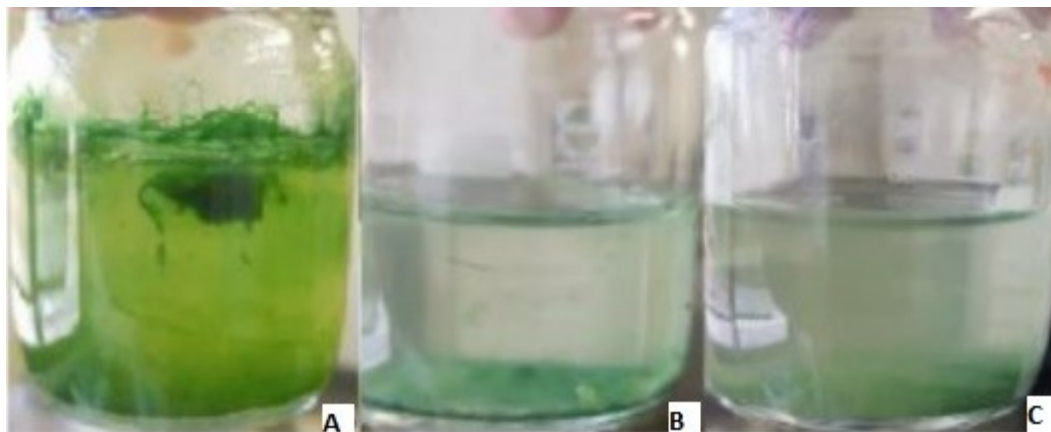


## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Estudo piloto

Os resultados visuais foram satisfatórios. A figura 6 mostra os ensaios realizados com ureia nas concentrações testadas após 14 dias, visualmente há semelhança no crescimento entre as concentrações testadas que são evidentemente inferiores ao crescimento observado no controle. Os resultados cinéticos para os ensaios com ureia e glicose foram inconclusivos e portanto não serão apresentados

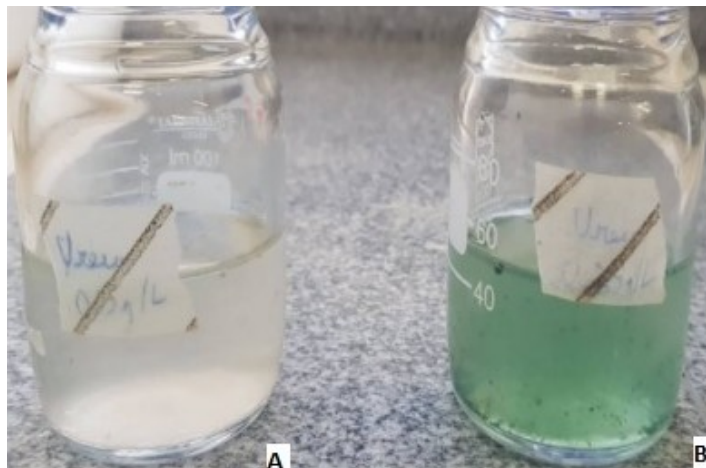
Alguns trabalhos já foram realizados utilizando esta fonte de nitrogênio e estes mostram um melhor desempenho do uso da ureia em processos com alimentação diária de ureia no meio de cultura (SÁNCHEZ-LUNA et al., 2007). A baixa eficiência da ureia como fonte de nitrogênio no experimento está provavelmente relacionada com a inibição por amônia, esta inibição é mais forte em baixas concentrações celulares (MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014) e também já foi observado em estudos com processo contínuo alimentado com ureia devido ao acúmulo de amônia (AVILA-LEON et al., 2012).



Fonte: Giovanne Brogiato

**Figura 6:** Cultivos de *A. platensis* dia 14, respectivamente A: controle, B: meio padrão modificado com ureia 0,5 g/L e C: meio padrão modificado com ureia 0,25 g/L

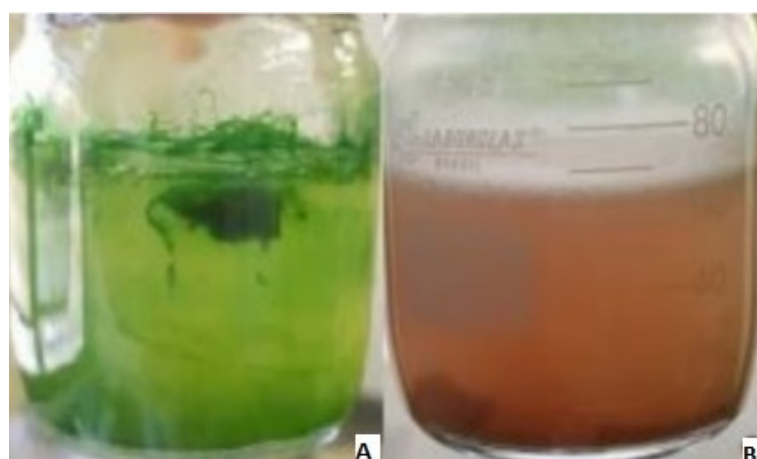
Esta possível inibição pelo acúmulo de amônia também foi observada, a figura 7 mostra a evolução dos cultivos após 40 dias de incubação e neste observou-se a morte da cultura crescida em ureia 0,5 g/L.



Fonte: Giovanne Brogiato

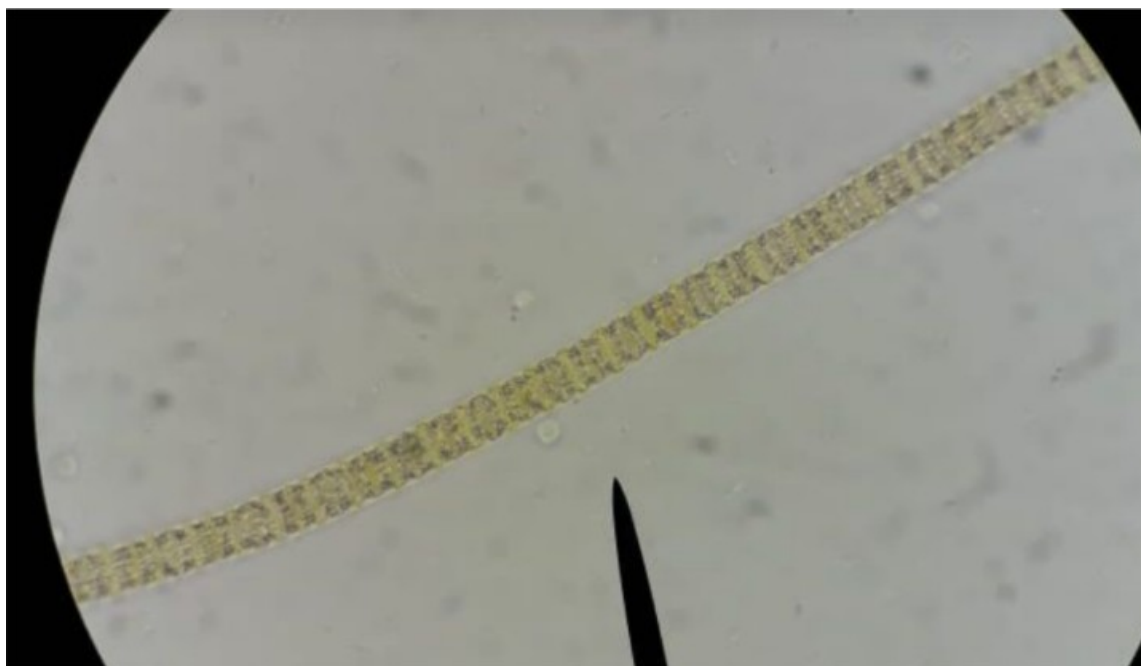
**Figura 7:** Cultivos de *A. platensis* dia 40, respectivamente A: meio padrão modificado com ureia 0,5 g/L, B: meio padrão modificado com ureia 0,25 g/L

Para os ensaios realizados com glicose 2 g/L observou-se a mudança de coloração para um tom mais vermelho (Figura 8 e Figura 9). Este cultivo foi então repicado novamente em meio Zarrouk modificado, sem a adição de glicose e no fim do período de cultivo retomou a cor verde observada no controle, além do acúmulo de células no fundo que diferente das outras culturas as células não se acumularam nas paredes do frasco buscando luz solar (Figura 10). Deste modo pôde-se afirmar que as células preferiram o uso direto da glicose à realização da fotossíntese, perdendo sua coloração verde ao longo do tempo.



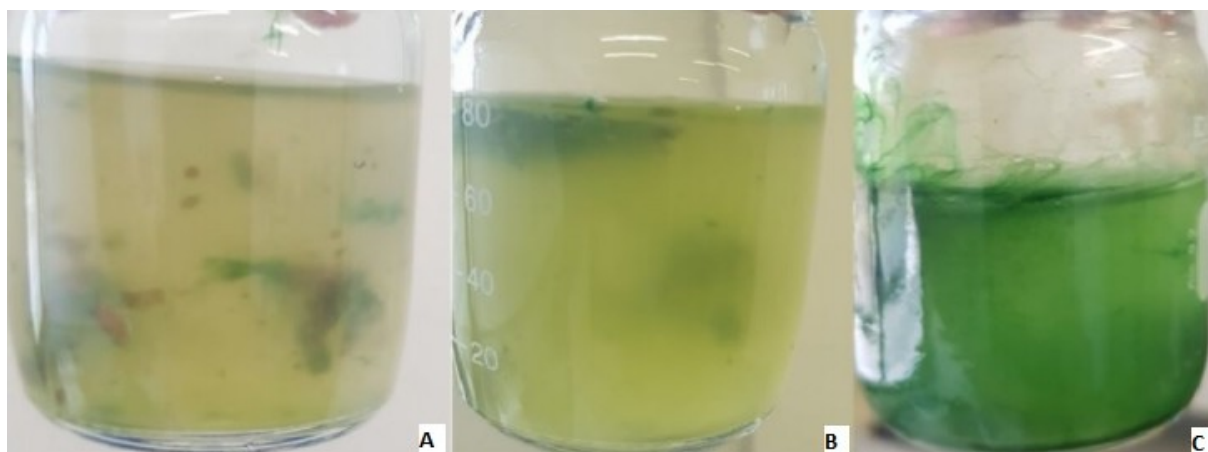
Fonte: Giovanne Brogiato

**Figura 8:** Cultivos de *A. platensis* dia 14, respectivamente A: controle e B: meio padrão modificado com glicose 2 g/L



Fonte: Giovanne Brogiato

**Figura 9:** Microscopia ótica (100x) *A. platensis* no dia 14, referente à cultura com glicose 2 g/L

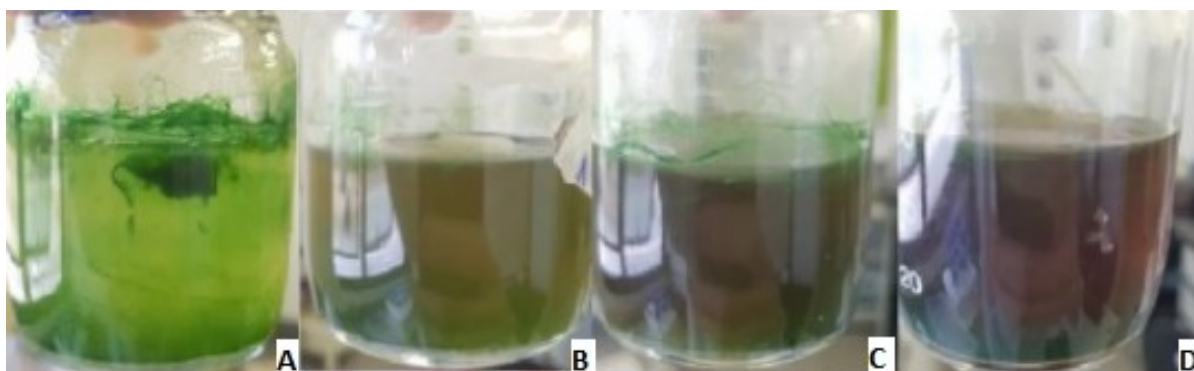


Fonte: Giovanne Brogiato

**Figura 10:** Repicagem do cultivo modificado com glicose 2 g/L em meio Zarrouk modificado respectivamente A: 2 dias, B: 4 dias, C: 14 dias.

Apesar de a preferência por glicose ser observada o bicarbonato de sódio ainda é uma fonte de carbono mais barata e devido aos dados cinéticos do cultivo com glicose terem sido inconclusivos preferiu-se manter o  $\text{NaHCO}_3$  para os testes com chorume de compostagem orgânica.

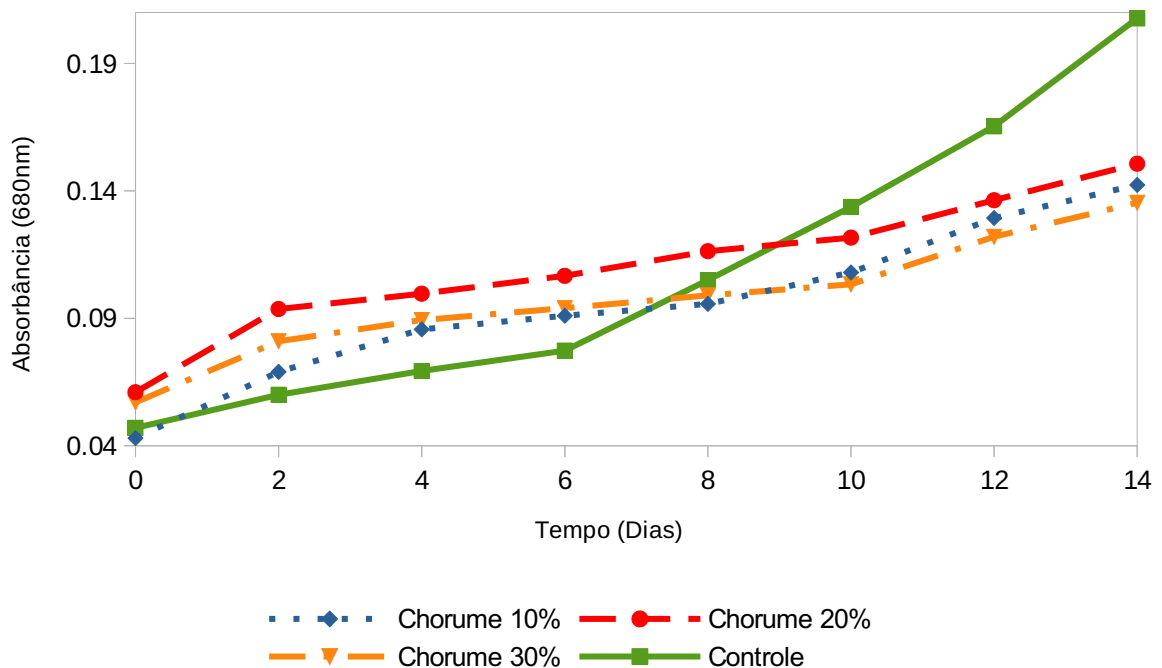
Nos testes realizados com chorume desejou-se estabelecer uma relação de volume com maior produtividade para o lote, uma vez que para este estudo ainda não havia sido feito nenhuma análise individual do chorume utilizado. Visualmente já observou-se um maior acúmulo das cianobactérias nas laterais do cultivo referente ao volume de 20% de chorume (Figura 11c).



Fonte: Giovanne Brogiato

**Figura 11:** Cultivo dia 14, respectivamente A: controle, B: chorume 10%, C: chorume 20% e D: chorume 30%.

Os dados referentes a medida de biomassa estão dispostos na Figura 12, neste pode-se observar a maior concentração celular durante todo o período de cultivo na amostra de 20%. Apesar dos estudos comprovarem a eficiência do chorume como suplemento do meio de cultura em todos os ensaios, não foi possível observar uma fase exponencial de crescimento em nenhuma das amostras, esta fase pôde ser observada a partir do dia 8 do cultivo realizado no controle.



Fonte: Giovanne Brogiato

**Figura 12:** Cinética de crescimento da biomassa a 680 nm. P-valor: Chorume 10%=0,06; Chorume 20%<0,05; Chorume 30%<0,05

## 4.2. Ampliação de escala

No primeiro cultivo realizado com meio de cultura suplementado com 20% em volume de chorume de compostagem orgânica, na escala de 20 L como teste do biorreator foi utilizado o mesmo lote de chorume do estudo piloto. Devido a coloração deste lote ser um pouco mais clara pôde-se observar facilmente a alteração da coloração para o verde com o crescimento celular (Figuras 13, 14 e 15).

Uma das barreiras do uso do chorume como suplemento do meio de cultura é a opacidade do meio de cultura variando por lote utilizado, a profundidade de reatores de escala comercial varia entre 15 e 20 cm para evitar que as células acumuladas no fundo não consigam absorver luz. Deste modo a agitação se torna extremamente necessária, circulando as células para que estas possam receber a quantidade de luz adequada a realização da fotossíntese.

Com a necessidade de agitação, algumas vezes é possível observar em culturas comerciais uma condição fisiológica única que devido a transição de uma situação de luz limitada para uma de saturação de luz resulta na foto inibição das



células (BOROWITZKA; VONSHAK, 2017), somando isso a opacidade do chorume o controle de agitação e luminosidade é um fator extremamente limitante para a ampliação para a escala comercial.



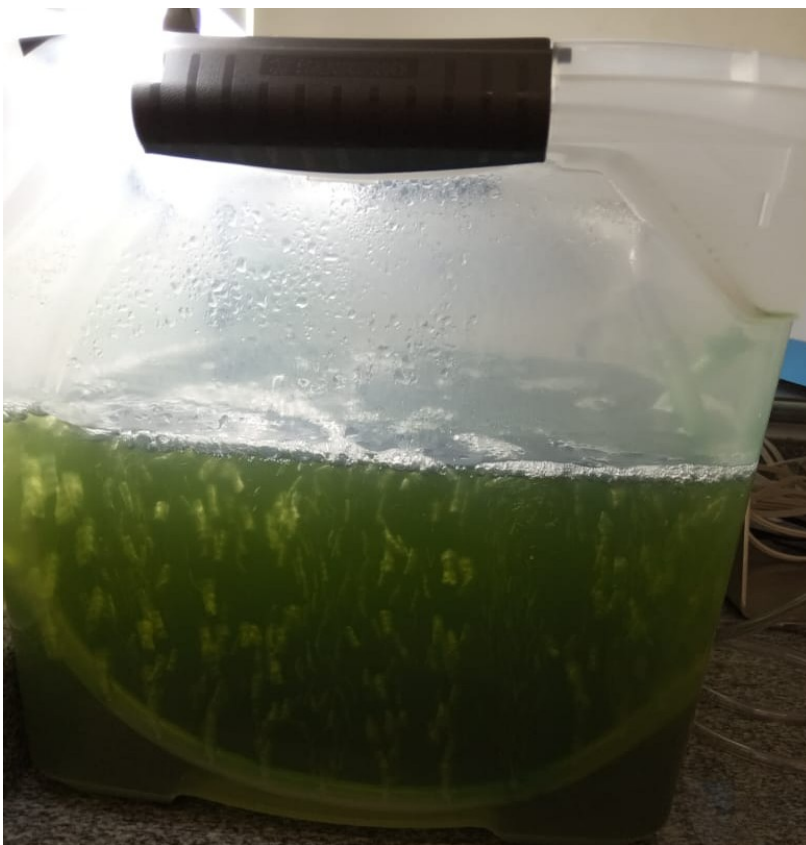
Fonte: Giovanne Brogiato

**Figura 13:** Primeiro cultivo de 20L com chorume 20%, dia 0.



Fonte: Giovanne Brogiato

**Figura 14:** Primeiro cultivo de 20L com chorume 20%, dia 7.



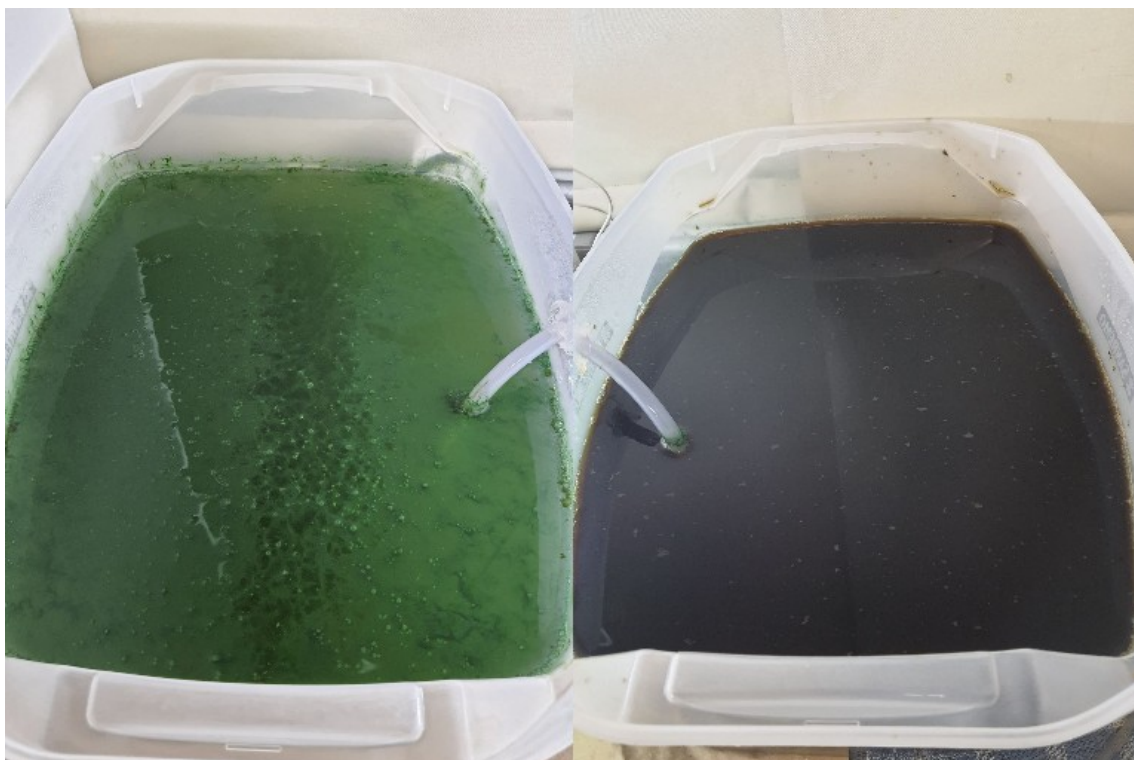
Fonte: Giovanne Brogiato

**Figura 15:** Primeiro cultivo de 20L com chorume 20%, dia 10.

Após a montagem do segundo biorreator para cultivo simultâneo de controle e amostra houve um problema com a bomba de ar utilizada, pois a partir do segundo, com o crescimento da biomassa, o ar foi insuficiente para agitar os dois reatores.

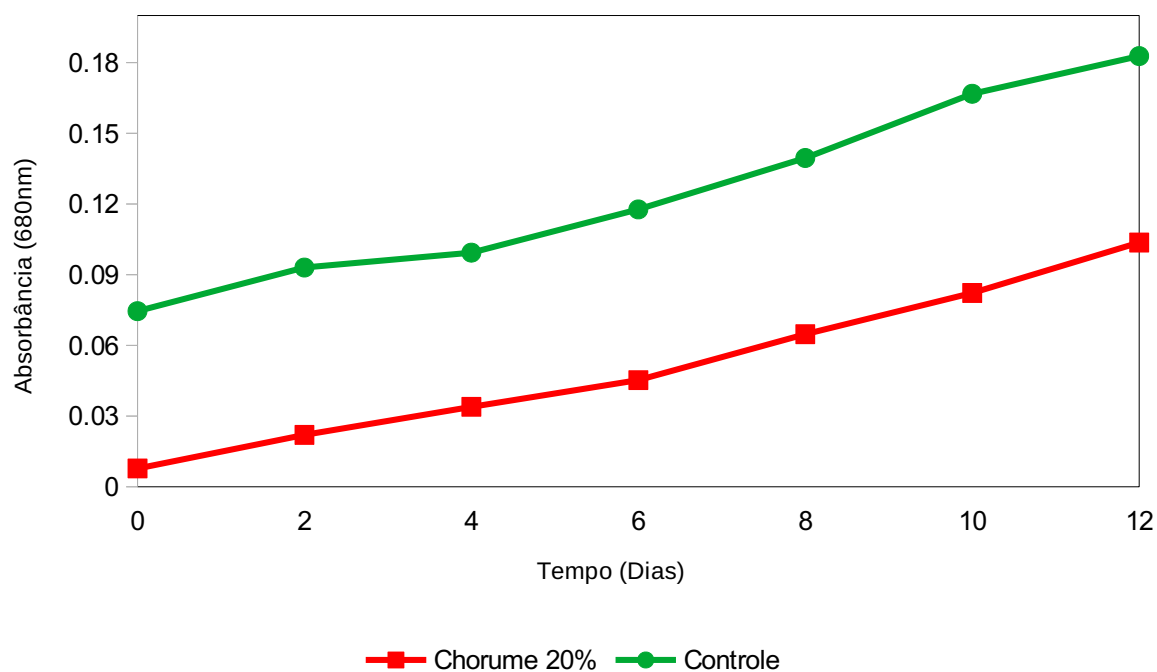
Além deste fator, o lote de chorume utilizado foi outro, este com coloração bem mais escura que o anterior e quase não sendo possível observar a olho nu a presença das células. A figura 16 mostra as culturas, controle e amostra, nas quais pode-se observar maior acúmulo nas laterais do controle, um acúmulo de células em ambas principalmente na mangueira.

Apesar dos problemas observados, a cinética de crescimento (Figura 17) mostrou uma similaridade no comportamento das duas curvas e, tanto para o controle quanto para a amostra, os valores obtidos foram similares aos obtidos no estudo piloto. A morfologia celular também se manteve a mesma (Figura 18).



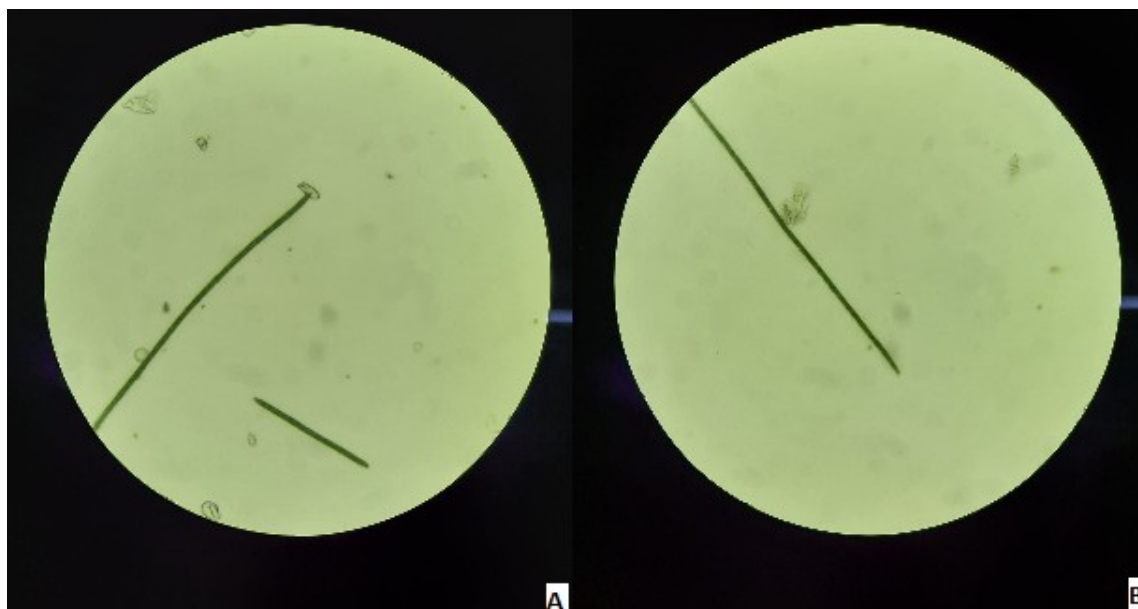
Fonte: Giovanne Brogiato

**Figura 16:** Segundo cultivo de 20L no dia 12, respectivamente controle a esquerda e chorume 20% a direita.



Fonte: Giovanne Brogiato

**Figura 17:** Absorbância medida a 680nm durante o período de crescimento dos cultivos em meio suplementado com chorume 20% e controle no volume de 20L. P-valor < 0,05



Fonte: Giovanne Brogiato

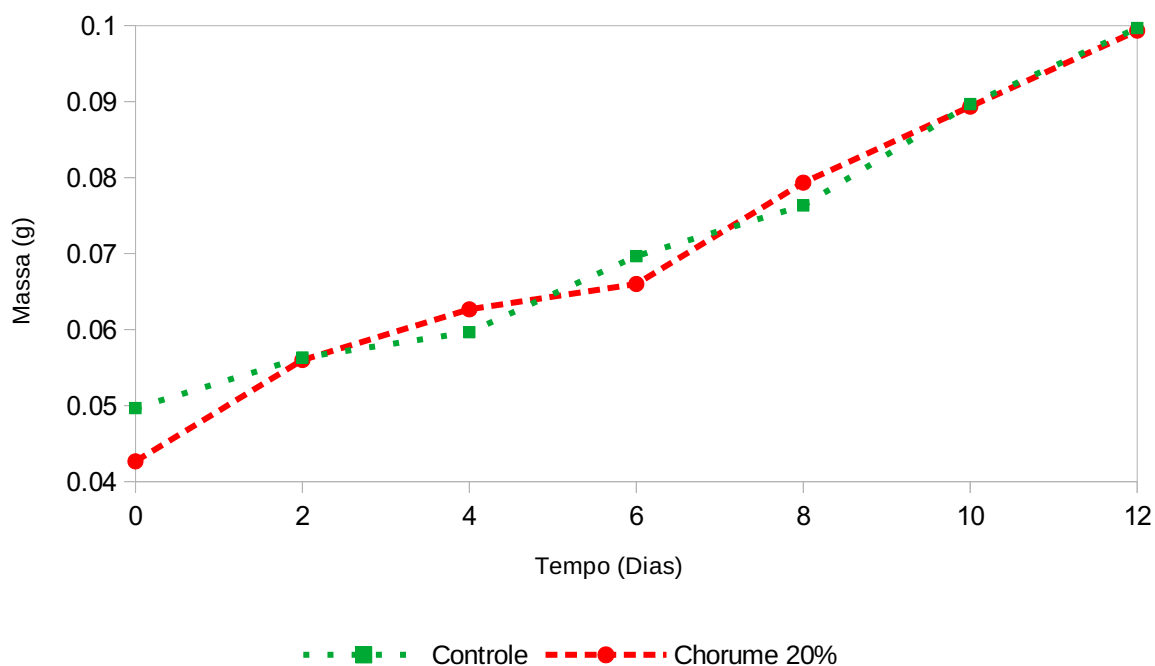
**Figura 18:** Microscopia ótica *A. platensis* (100x), respectivamente A: controle e B: chorume 20%

Nestes cultivos também foi realizada a medida de crescimento por peso de massa seca (Figura 19) que acabou se mostrando melhores resultados que a de densidade ótica. Apesar das curvas construídas com a densidade ótica terem um comportamento muito similar, a quantidade observada aparentava ser mais baixa no cultivo com chorume. Em contrapartida na medida por peso de massa seca foi possível observar valores muito próximos para ambas as culturas.

A similaridade observada nas curvas construídas na medida de biomassa por densidade ótica e os valores na medida por peso de massa seca são ótimos resultados que comprovam o potencial do chorume de compostagem orgânica como suplemento ao meio de cultura.

Contudo os valores obtidos para densidade ótica encontram-se muito abaixo dos encontrados na literatura (CASTRO et al., 2015; DELRUE et al., 2017) e mesmo com divergências entre uma metodologia e outra a determinação de crescimento da biomassa de *A. platensis* encontrada na literatura atual utiliza por padrão medidas de densidade ótica. É necessário considerar que nos estudos acima mencionados as condições de cultivo foram otimizadas, o que não pode ser realizado no presente estudo.

Deste modo, com adaptações na metodologia de medida de densidade ótica, otimização de luminosidade, agitação e temperatura e devido as similaridades encontradas nos resultados obtidos o meio de cultura suplementado com chorume de compostagem orgânica mostrou potencial para atingir uma produtividade tão boa quanto o meio de cultura padrão.



Fonte: Giovanne Brogiato

**Figura 19:** Massa seca obtida em 2mL de amostra em duplicata durante o período de crescimento dos cultivos em meio suplementado com chorume 20% e controle no volume de 20L. P-valor < 0,05

#### 4.3. Ensaio analítico

As amostras enviadas para o ensaio analítico foram retiradas dos primeiros testes de ampliação de escala e também do lote de chorume proveniente de compostagem orgânica utilizado no experimento.

Observa-se diferenças entre o chorume e a cultura realizada no meio alternativo quanto aos resíduos minerais + orgânicos (RMO), matéria orgânica, resíduo mineral solúvel (R.M.S.), resíduo mineral total (R.M.T.) e nestes mesmos resultados observa-se maior similaridade de valores da cultura amostral com a cultura controle do que com o chorume utilizado. Deste modo e levando em consideração que o chorume utilizado foi diluído para produção do meio de cultura, pode-se concluir que o aumento destes valores observados em ambas as culturas são referentes à produção de biomassa de *Arthrospira platensis* (Tabela 3).

Além disso observa-se na análise do chorume a presença de nitrogênio, cálcio, magnésio, zinco e ferro e estes reagentes são suplementos utilizados no

meio de cultura padrão, mostrados na tabela 1. Tais dados comprovam a eficácia do chorume como suplemento para o meio de cultura de *A. platensis*, podendo até ser reduzida a quantidade de  $\text{NaNO}_3$  utilizada no meio de cultura devido à presença de nitrogênio no chorume.

**Tabela 3:** Ensaio analítico realizado pela DSMA para 2L de amostra dos cultivos de 20L com chorume 20%, controle e para o lote de chorume utilizado

	<i>A.platensis</i> Controle	<i>A.platensis</i> Chorume	Chorume	Unidade
pH	9,7	9,7	8,4	
Densidade	0,98	0,98	0,97	g/mL
Resíduo mineral + Orgânico (RMO)	11,98	16,3	9,84	g/L
Matéria orgânica	2,02	3,32	4,58	g/L
Resíduo mineral solúvel (R.M.S.)	9,96	12,98	5,26	g/L
Carbono total	1,12	1,84	2,54	g/L
Resíduo mineral total (R.M.T.)	10,34	13,38	5,78	g/L
Resíduo mineral insolúvel (R.M.I.)	0,38	0,4	0,52	g/L
Nitrogênio total	0,28	0,28	0,95	g/L
Fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ )	0,17	0,02	0,04	g/L
Potássio ( $\text{K}_2\text{O}$ )	0,12	0,45	3,6	g/L
Cálcio	0,85	0,81	0,86	g/L
Magnésio	0,06	0,06	0,09	g/L
Enxofre ( $\text{SO}_4$ ) total	1,66	2,93	2,72	g/L
Cobre	0	0	0	mg/L
Zinco	4	3	3	mg/L
Manganês	0	3	3	mg/L
Ferro	14	10	11	mg/L
Sódio	4700	5600	380	mg/L

#### 4.4. Ensaio piloto de *A. platensis* como biofertilizante

O acompanhamento do estudo realizado referente ao uso da biomassa produzida em meio de cultura suplementado com chorume de compostagem orgânica ocorreu em duas etapas do processo de crescimento das alfaces. A primeira foi feita 15 dias após o plantio na qual visualmente observou-se um crescimento mais rápido nas amostras tratadas em relação as amostras não tratadas (Figuras 20 e 21).

Além disso foram selecionadas duas amostras cujo critério de seleção foi a menor e a maior de ambos. Estas foram levadas ao laboratório, lavadas, secas e então pesadas em balança analítica (Figura 22), os dados obtidos mostram que a menor amostra do controle corresponde a aproximadamente 69% da massa da tratada e a maior selecionada aproximadamente 87% da massa da tratada. Estes

dados mostraram um crescimento mais homogêneo e mais rápido. A diferença observada na massa corresponde principalmente às folhas da alface, não foi observada diferença nas raízes.

A solução contendo *A. platensis* e meio suplementado com chorume de compostagem orgânica foi reaplicada e a segunda análise foi realizada no momento da colheita final. Esta foi realizada pelo responsável da Fazenda Santa Bárbara Orgânicos, no momento decidido por ele 32 dias após o plantio. O critério para colheita foi quando ambos, amostra e controle, estivessem com tamanho ideal segundo o responsável. A seleção das amostras também foi realizada por ele e as amostras foram escolhidas ao acaso.

Após levadas ao laboratório estas foram lavadas e pesadas, os dados obtidos estão dispostos na Tabela 4 e nas figuras 23 e 24. Apesar da maior amostra pesada ser referente ao grupo de controle as amostras tratadas tiveram uma média de massa maior, mostrando maior homogeneidade no crescimento mas com uma diferença menos significativa da observada na metade do processo.

Além do monitoramento das massas foram retiradas folhas ao acaso das amostras, de ambos os testes, que passaram por um processo de extração em etanol e foram medidos em espectrofotômetro comprimentos referentes a clorofilas A e B, nitrato e carotenoides (Figura 25). Pôde-se observar valores maiores no grupo tratado, com exceção para a clorofila A, contudo as diferenças não foram muito significativas.

**Tabela 4:** Massas das 10 amostras de alface colhidas ao fim do período de crescimento com e sem tratamento

Massas (g)	
Controle	Tratadas
378,4	364,84
306,26	361,81
305,69	305,45
293,76	304
288,46	295,73
266,69	263,56
255,26	248,17
222,44	238,93
173,48	190,53
164,01	185,3
Média	265,445
	275,832



Os resultados obtidos mostraram um aumento médio de biomassa de aproximadamente 4% para as alfaces tratadas comparadas ao controle. Deve-se levar em consideração que o espaço disponibilizado para o ensaio utiliza tratamento próprio na terra utilizada, e estava presente em ambos, controle e amostra. De acordo com a literatura, em um estudo que avaliou a eficiência do uso de *A. platensis* na suplementação de tomates, mostrou que o impacto pode ser de até 48% no aumento da biomassa das plantas e 43% na biomassa dos frutos (AGHOFACK; SCHINZOUKKA; TATCHAGO, 2015).

Devemos considerar também o método de aplicação utilizado, os ensaios com o biofertilizante de *A. platensis* com chorume de compostagem orgânica foram realizados com aplicação direta na terra. Testes feitos com rabanete testaram a aplicação de *A. platensis* com os métodos de spray foliar, revestimento de sementes e imersão de sementes, obtendo melhores resultados quanto ao comprimento das plantas e biomassa com o spray foliar (GODLEWSKA et al., 2019).



Fonte: Giovanne Brogiato

**Figura 20:** Plantação de alface Fazenda Santa Bárbara, Jambeiro. Dia 15, respectivamente A: controle e B: tratadas.





Fonte: Giovanne Brogiato

**Figura 21:** Maiores alfaces selecionadas 15 dias após o plantio, respectivamente na direita A: controle e à esquerda B: tratadas.



Fonte: Giovanne Brogiato

**Figura 22:** Menores alfaces selecionadas à esquerda e maiores alfaces selecionadas à direita 15 dias após o plantio, respectivamente A: controle e B: tratadas.





Fonte: Giovane Brogiato

**Figura 23:** Alfaces selecionadas aleatoriamente no final do período de crescimento referente ao controle.

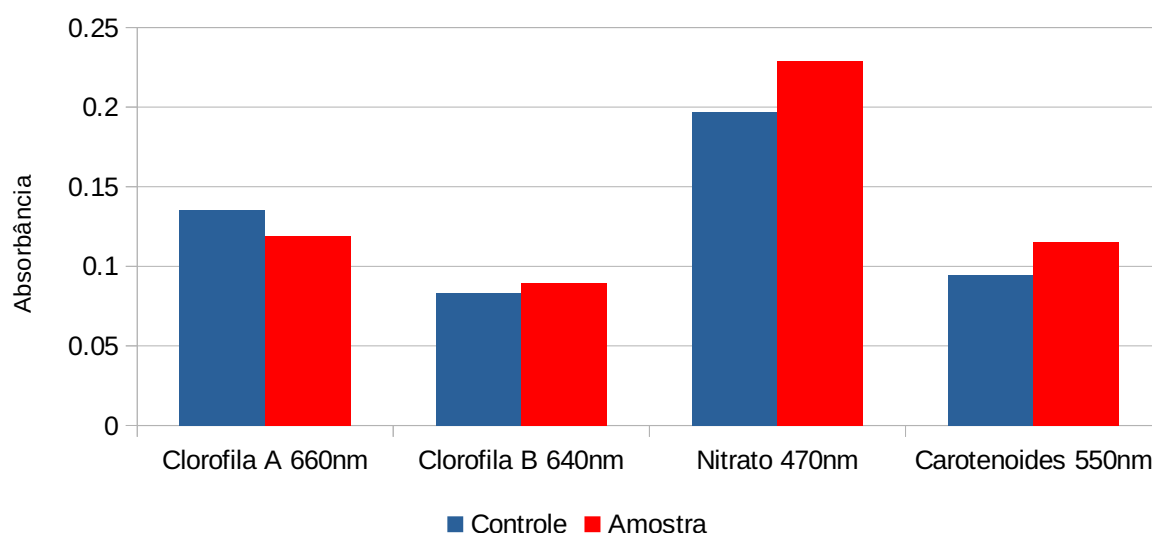




Fonte: Giovane Brogiato

**Figura 24:** Alfaces selecionadas aleatoriamente no final do período de crescimento referente às amostras tratadas.

### Absorbância em diferentes comprimentos para Clorofila A e B, Nitrato e Carotenoides



Fonte: Giovanne Brogiato

**Figura 25:** Absorbância medida nos comprimentos de onda referentes a clorofila A e B, nitrato e carotenoides nas alfaces controle e tratadas

## 5. CONCLUSÃO

Durante o presente projeto foi possível evidenciar a viabilidade do uso do chorume proveniente de compostagem orgânica como suplemento ao meio de cultura para produção de biomassa de *Arthrospira platensis*. Os resultados obtidos mostraram um perfil de crescimento muito parecido do meio de cultura suplementado com chorume de compostagem orgânica comparado ao controle.

O meio de cultura utilizado como controle é um meio padrão utilizado em laboratório, não sendo aplicado em escala comercial devido ao alto custo dos reagentes. Com os resultados obtidos pôde-se então concluir que o uso do chorume como suplemento do meio de cultura em escala comercial tem grande potencial para aumentar a produtividade mantendo baixo custo de produção. Apesar de o chorume ter uma composição extremamente variável, dependendo do que é usado na sua produção, desde o início do projeto três lotes de chorume foram utilizados e todos favoreceram o crescimento desta cianobactéria.

Contudo não foram aplicados ao estudo fatores importantes que são usados em escala comercial, como a agitação e a produção em fotobiorreator do tipo raceway, o que, se realizado, espera-se uma melhoria no desempenho do meio de cultura alternativo devido a complicação de absorção de luz causada pela coloração, ausência de agitação e profundidade do reator.

O ensaio analítico com o chorume também mostrou o potencial de adaptação da formulação do meio de cultura, reduzindo ou retirando outras fontes de nitrogênio. Para validação disto é necessário verificar a consistência da presença deste nutriente em diferentes lotes.

Quanto a aplicação da biomassa com o chorume de compostagem orgânica na agricultura, os testes mostram um adiantamento do período de colheita. Quanto aos dados obtidos para o aumento da biomassa na plantação, estes são promissores quanto ao uso desta cianobactéria e do chorume de compostagem orgânica como bioinoculante, favorecendo um aumento da biomassa média final observada em alfaces mesmo com outros tratamentos presentes.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHOFACK, J.; SCHINZOUMKA, PA; TATCHAGO, V. Effets des extraits ou de la poudre de *Spirulina platensis* et *Jatropha curcas* sur la croissance et le développement de la tomate. **Journal of Applied Biosciences**, [S. l.], v. 90, n. 1, p. 8413, 2015. DOI: 10.4314/jab.v90i1.2.

AVANCINI, Anita Ribas; MATOSO, Ester Schiavon; CERQUEIRA, Vanessa Sacramento; DELMAR, Sérgio. Caracterização química dos compostos líquidos oriundos da compostagem de resíduos agroenergéticos. **Simpósio sobre Sistemas Sustentáveis**, [S. l.], 2019.

AVILA-LEON, I.; CHUEI MATSUDO, M.; SATO, S.; DE CARVALHO, J. C. M. *Arthrospira platensis* biomass with high protein content cultivated in continuous process using urea as nitrogen source. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 112, n. 6, p. 1086–1094, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05303.x.



BERNAL-CASTILLO, Jaime; ROZO, Camilo; RODRÍGUEZ, Gnacio. SPIRULINA (ARTHROSPIRA): AN EDIBLE MICROORGANISM: A REVIEW. **Nº**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 7–24, 2003.

BOLD, H. C. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama*, Sp. Nov. **Bulletin of torrey botanical club**, [S. l.], v. 76, n. 3, p. 101–108, 1949.

BOROWITZKA, Michael A.; VONSHAK, Avigad. Scaling up microalgal cultures to commercial scale. **European Journal of Phycology**, [S. l.], v. 52, n. 4, p. 407–418, 2017. DOI: 10.1080/09670262.2017.1365177. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09670262.2017.1365177>.

CAPELLI, Bob; CYSEWSKI, Gerald R. Potential health benefits of spirulina microalgae. A review of the existing literature. **Nutra Food**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 19–26, 2010. DOI: 10.1007/BF03223332.

CASTRO, Gabriela Fernandes Pepe da Silva De; RIZZO, Roberta Ferreira; PASSOS, Thaís Souza; SANTOS, Beatriz Nascimento Corrêa Dos; DIAS, Daiana da Silva; DOMINGUES, Josiane Roberto; ARAÚJO, Kátia Gomes de Lima. Biomass production by *Arthrospira platensis* under different culture conditions. **Food Science and Technology (Campinas)**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 18–24, 2015. DOI: 10.1590/1678-457X.6421. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612015000100018&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612015000100018&lng=en&nrm=iso&tlng=en).

COLLA, Luciane Maria; OLIVEIRA REINEHR, Christian; REICHERT, Carolina; COSTA, Jorge Alberto Vieira. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 98, n. 7, p. 1489–1493, 2007. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.09.030.

DELRUE, Florian; ALAUX, Emilie; MOUDJAOUI, Lagia; GAINARD, Clément; FLEURY, Gatien; PERILHOU, Amaury; RICHAUD, Pierre; PETITJEAN, Martin; SASSI, Jean-François. Optimization of *Arthrospira platensis* (Spirulina) Growth: From Laboratory Scale to Pilot Scale. **Fermentation**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 59, 2017. DOI: 10.3390/fermentation3040059.

GODLEWSKA, K.; MICHALAK, I.; PACYGA, P.; BAŚLADYŃSKA, S.; CHOJNACKA, K. Potential applications of cyanobacteria: *Spirulina platensis* filtrates and homogenates in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 1–18, 2019. DOI: 10.1007/s11274-019-2653-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2653-6>.

Handbook of Microalgal Culture. **Handbook of Microalgal Culture**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1002/9781118567166.

JIMÉNEZ, Carlos; COSSÍO, Belén R.; LABELLA, Diego; NIELL, F. Xavier. The feasibility of industrial production of *Spirulina* (*Arthrospira*) in Southern Spain. **Aquaculture**, [S. l.], v. 217, n. 1–4, p. 179–190, 2003. DOI: 10.1016/S0044-8486(02)00118-7.

KUMAR, Kanhaiya; DASGUPTA, Chitralekha Nag; NAYAK, Bikram; LINDBLAD, Peter; DAS, Debabrata. Development of suitable photobioreactors for CO<sub>2</sub> sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 8, p. 4945–4953, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.01.054. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.054>.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., & COX, M. M. **Principles of Biochemistry Lehninger Sixth edition**. [s.l.: s.n.].

MARKOU, Giorgos; VANDAMME, Dries; MUYLAERT, Koenraad. Ammonia inhibition on *Arthrospira platensis* in relation to the initial biomass density and pH. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 166, p. 259–265, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.05.040. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.040>.

MULITERNO, Adriana; MOSELE, Patrícia Correa; COSTA, Jorge Alberto Vieira; HEMKEMEIER, Marcelo; BERTOLIN, Telma Elita; COLLA, Luciane Maria. Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* em batelada alimentada. **Ciência e Agrotecnologia**, [S. l.], v. 29, n. 6, p. 1132–1138, 2005. DOI: 10.1590/s1413-70542005000600005.

NABOUT, João Carlos; DA SILVA ROCHA, Barbbara; CARNEIRO, Fernanda Melo; SANT'ANNA, Célia Leite. How many species of Cyanobacteria are there? Using a

discovery curve to predict the species number. **Biodiversity and Conservation**, [S. l.], v. 22, n. 12, p. 2907–2918, 2013. DOI: 10.1007/s10531-013-0561-x.

PNRS. **Governo Federal. Plano Nacional de Resíduos Sólidos.MMA Publicações**. [s.l: s.n.].

RAGHAB, Safaa M.; ABD EL MEGUID, Ahmed M.; HEGAZI, Hala A. Treatment of leachate from municipal solid waste landfill. **HBRC Journal**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 187–192, 2013. DOI: 10.1016/j.hbrcj.2013.05.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hbrcj.2013.05.007>.

RODRIGUES, M. S.; FERREIRA, L. S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*: Potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 101, n. 12, p. 4491–4498, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.054. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.054>.

SÁNCHEZ-LUNA, L. D.; BEZERRA, R. P.; MATSUDO, M. C.; SATO, S.; CONVERTI, A.; DE CARVALHO, J. C. M. Influence of pH, Temperature, and Urea Molar Flowrate on *Arthrospira platensis* Fed-Batch Cultivation: A Kinetic and Thermodynamic Approach. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.], v. 96, p. 702–711, 2007. DOI: 10.1002/bit.

VALENTE, B. S.; XAVIER, E. G.; MORSELLI, T. B. G. A.; JAHNKE, D. S.; DE S. BRUM JR, B.; CABRERA, B. R.; DE O. MORAES, P.; LOPES, D. C. N. Fatores que afetam o desenvolvimento da compostagem de resíduos orgânicos. **Archivos de zootecnia**, [S. l.], v. 58, p. 59–85, 2011. DOI: 10.1109/wicom.2011.6040239.

ZAHRA, Zahra; CHOO, Da Hyun; LEE, Heayyeon; PARVEEN, Amna. Cyanobacteria: Review of current potentials and applications. **Environments - MDPI**, [S. l.], v. 7, n. 2, 2020. DOI: 10.3390/environments7020013.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima***. Ph.D. Thesis, Université de Paris, Paris. [s.l.] : Springer Netherlands, 1966. DOI: 10.1007/s11274-015-1892-4.